

第 28 卷 第 5 期
2013 年 5 月

地球科学进展
ADVANCES IN EARTH SCIENCE

Vol. 28 No. 5
May 2013

陈纪新, 黄邦钦, 柳欣. 海洋浮游生物原位观测技术研究进展[J]. 地球科学进展, 2013, 28(5): 572-576. [Chen Jixin, Huang Bangqin, Liu Xin. The progress of in situ observation of marine plankton[J]. Advances in Earth Science, 2013, 28(5): 572-576.]

海洋浮游生物原位观测技术研究进展^{*}

陈纪新, 黄邦钦^{*}, 柳欣

(近海海洋环境科学国家重点实验室, 厦门大学环境与生态学院, 福建 厦门 361005)

摘 要: 原位观测技术在生物海洋学过程研究中的应用, 从海洋生物多样性、海洋生物的生理生态响应和宏观的生态过程及其变动机制等方向的研究中得到迅速的发展, 极大提高了对海洋生物学、生态学以及不同时空尺度生物地球化学过程的认识。包括原位光学检测技术、水下显微摄像与自动化鉴定技术、水下流式细胞技术、分子生物传感器等新型原位观测技术, 拓宽了各类型观测平台的研究对象范围。重点阐述生物海洋学原位观测技术的发展现状、应用实例及其在立体海洋观测系统中的应用前景。

关 键 词: 海洋浮游生物; 原位观测; 分子生物传感器; 流式细胞; 生物光学

中图分类号: P71 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-8166(2013)05-0572-05

1 引 言

海洋观测的方法与方式很大程度上决定了我们对海洋认识的程度。海洋水文、化学、生物过程具有从毫秒到千年时间尺度、从微米到全球范围空间尺度的差异^[1]。海洋观测的频率和持续时间很大程度上决定了我们所能了解到的“真相”。早期的海洋科学研究主要通过科考船调查观测, 船舶调查具有短期、临时性特征, 调查的时间、经费导致了空间与时间的限制。因此, 这种观测通常只能提供海洋过程中的片段, 缺乏对各种空间(边界流、涡、全球变化等)和时间尺度(天、月、季、年、百年等)的海洋过程的正确认识^[2]。

过去几十年时间内, 不依赖船舶调查方式的海洋原位观测平台有着飞速发展, 极大拓宽了海洋观测的时空尺度, 开创了海洋学研究的新时代。在空间尺度上, 可移动的平台比如漂浮浮标(Float, Drift-

er)、自航式观测平台(AUV)及水下滑翔机(Gliders)等可以将原位观测范围拓宽至数千公里, 这些可移动的平台可以通过随水团运动模式或者巡航模式对特定水团或海域进行观测^[3]。基于海底锚定的观测平台则在时间尺度上提供了高频率、连续的观测数据, 这类观测平台包括独立观测点(如锚定浮标或潜标)或由独立观测点整合形成的观测网络。近年来, 通过海底布放电缆, 从陆地传输电能, 并实现高通量数据传递的有缆观测平台促进了各类传感器与其他设备的布放(如 MARS, Venus, Neptune 等), 形成以海底观测网络为代表的第三观测平台^[4], 构成海洋学 4D 观测体系(三维空间+时间), 促使海洋科学从“考察型”向“观测型”转变。

海洋浮游生物是海洋生态系统中基础组成部分, 在整个食物链物质循环和能量流动中起到重要的作用。浮游生物的生理、生态、多样性和过程研究是理解海洋资源、地球生物多样性水平、气候变化对

^{*} 收稿日期: 2013-04-07; 修回日期: 2013-04-12.

^{*} 基金项目: 国家自然科学基金项目“典型海区基于功能群的浮游植物群落结构及其与颗粒有机碳输出的耦合”(编号: 40925018)资助.

作者简介: 陈纪新(1978-), 男, 福建平潭人, 高级工程师, 主要从事生物海洋学的现场原位观测和仪器研发.

E-mail: brigchen@xmu.edu.cn

^{*} 通讯作者: 黄邦钦(1964-), 男, 福建闽清人, 教授, 主要从事海洋浮游生物生态研究. **E-mail:** bqhuang@xmu.edu.cn

生态系统影响不可以缺少的一环。相对于物理、化学海洋学的原位观测技术应用现状而言,目前海洋浮游生物的观测更多依赖于传统手段,其自动观测的应用非常有限。虽然近几十年得到迅速发展的观测平台,锚系浮标、漂浮浮标、水下滑翔机及海底观测网等在物理海洋或地质过程的自动观测上已经得到成熟、广泛和成功的应用,但是这些观测平台对海洋生物信息的获取仍然非常有限,其中关键问题在于实用的海洋生物观测技术(传感器)较少。成功将海洋生物原位观测技术、设备(生物传感器)整合到观测平台,对于拓宽观测平台信息获取量,深入海洋生物地球化学耦合过程的理解具有重要意义。目前,海洋浮游生物的原位观测技术较为有限,多数浮游生物自动观测系统是基于光学基础,同时在以声学、水下摄像、单细胞分析、分子生物学等基础上发展的其他原位观测技术也成为发展的热点。本文论述海洋浮游生物原位观测技术的发展现状,并讨论应用前景与发展方向。

2 原位观测技术与应用现状

目前已经得到一定程度应用的海洋生物原位观测技术主要可以归纳为表 1 中的几种类型。

2.1 基于声学的观测技术

声学技术在海洋生物观测中最主要应用于鱼类和哺乳动物的观测。通过水听器对海洋生物声波的监听与记录,可以观测到鱼类和哺乳动物的分布、迁徙、种群动态等。由于浮游生物与海水密度差异导致声波传递速率不同,利用高频声波水声探测系统(如声学多普勒流速剖面仪——ADCP、多频率水声剖面系统——MAPS、宽波段声纳等),可以对不同类群的浮游生物分布进行定量观测。声学方法的最大优势在于,能够在比较大的空间尺度上及三维空间高频率展示浮游生物的分布。相对来说,应用于浮游生物的商业化声学仪器较少,主要由各实验室

开发并初步应用,目前已经较成功地应用于研究与物理海洋环境有关的浮游动物分布特征,如大西洋湾流^[5]、冷暖涡^[6]、锋面^[7]、北太平洋中层水^[8]等物理海洋环境对生物分布的影响。声学设备在长时间观测上也得到应用,研究了浮游动物昼夜垂直迁移的季节变化。如伍兹霍尔海洋研究所(Woods Hole Oceanographic Institution,WHOI)设计的 BIOMAPER II (Bio-Optical Multifrequency Acoustical and Physical Environmental Recorder) 采用了多频率(5 个波长)声学系统,这套系统已经成功应用于南大洋锚定观测平台达数年时间^[9,10],观测到多种中型浮游动物优势种群空间分布与种群变动过程。基于声学的原位观测方法虽然在观测频率、空间范围与长时间观测上具有突出的优势,但是其对浮游动物种类组分的分辨能力差、定量不准确,通常需结合光学成像分析方法或其他传统浮游动物采样方法^[11]。

2.2 基于光学的观测技术

基于光学的海洋浮游生物观测技术可以分为 3 类,第一类是基于浮游植物色素光学特征(光合色素吸收光谱与叶绿素荧光特征);第二类是利用在海水中与浮游生物相关的光强度、光衰减及散射等特征;第三类是利用水下摄像(包括显微摄像)记录浮游生物的成像与图像分析系统。

浮游植物光学特征在群落水平或个体水平上得到较深入的应用,其中浮游植物的叶绿素荧光仪是目前技术最成熟、种类最多、应用最广的海洋生物原位观测设备。自 20 世纪 60 年代开始,叶绿素 a 荧光被广泛用于评估浮游植物丰度(生物量)的变动^[12]。叶绿素 a 荧光测量是一种快速、灵敏、非破坏性、低能耗的测量方式,因此叶绿素荧光探头成为走航观测、生态浮标、生态漂浮式浮标(Bio-Float)等自动观测平台的必备探头。荧光技术与设备的发展主要在 2 个方面,一方面,利用不同类群浮游植物的色素组成不同,进而具备不同的吸收光谱特征,结合

表 1 浮游生物原位观测技术类型及比较
Table 1 Characteristics and comparison of in situ techniques for plankton observation

技术类型	浮游生物类型和粒级	类群组成	生态功能和动力学	采样频率级别	空间尺度
声学	中型及以上浮游生物	粒级和优势种	无	秒	较大空间尺度、海水剖面
水下摄像/显微摄像	中型及以上浮游生物	种类	无	秒	较大空间尺度或定点
叶绿素荧光	全粒级浮游植物	色素特征类群	初级生产力	秒	海水剖面或定点
生物光学	浮游生物	粒级	无	秒	海水剖面
流式细胞技术	小型及以下浮游生物	种类	无	分钟	定点
分子生物传感器	小型及以下浮游生物	种类	生态功能活性	小时	定点

吸光光谱与叶绿素荧光,可以对不同类群的浮游植物进行定量分析,如 BBE Fluoroprobe, Walz Multi-color PAM, Satlantic ALFA 等。另一方面,利用藻类荧光诱导理论,即浮游植物荧光发射的变动对应于激发能量的变动,基于光合系统 II(PSII)饱和动力学的可变荧光参数,可应用于计算浮游植物初级生产力的关键光合参数^[13]。应用荧光技术来评估水生生态系统的初级生产力,克服产氧法、¹⁴C 培养法等传统初级生产力测量方法技术的诸多限制。已经商业化并得到较广泛应用的,可变荧光仪器包括 Walz PhytoPAM, FAST^{tracka} FRRF, Satlantic FRe 和 BBE AOA 等^[13]。目前可变荧光设备主要用于船载海水剖面测量或走航测量模式,如 BBE AOA 被广泛应用于各种 Ferrybox 走航观测平台^[14]。

海水光学特征与浮游生物的存在紧密相关,具有丰富的信息,因此,产生了一系列的海洋生物光学原位观测方向与设备,如 SeaTech 公司的透射仪(Transmissometer),以及 Hobil Labs 的水体光学剖面测量系统(HydroProfiler)等。生物光学传感器具备低能耗、高频率与应用空间范围大的特点,也成为经常应用于原位观测平台的传感器。海洋生物光学在原位观测上一个较成功的应用是 Bio-Argo 浮标,Bio-Argo 浮标是在只用于物理海洋学观测的 Argo 剖面浮标基础上结合几种生物光学传感器形成的新的综合性海洋观测平台^[15],是目前 Argo 项目的一个主要发展方向。

利用水下成像系统对浮游生物进行直接的图像记录是进行海洋浮游生物观测最直观的方法,特别是对中型以上粒级的浮游动物,已经有多种成像系统成功地应用于大面调查或种类鉴定,如浮游生物录像记录仪(Video Plankton Recorder, VPR)、水下录像剖面仪(Underwater Video Profiler, UVP)和浮游动物可视与成像系统(Zooplankton Visualization and Imaging System)等。这些水下成像系统可以记录从 10 μm 到几厘米大小不同的浮游生物光学图像,通过图像识别系统对浮游生物进行种类鉴定与定量。其中 VPR 应用最广泛,其成功应用于美国 GLOBEC 乔治浅滩项目(Georges Bank Regional Program)等多个海洋现场,连续多年观测中型浮游动物不同种类的时空分布^[16]。它也被应用于 BIOMAPPER II 观测平台,与声学传感器结合实现对浮游动物更全面地观测^[9]。相对于浮游动物,水下浮游植物成像系统要求具备更大倍率的显微镜头,由于在大倍率的显微镜头下对光、焦距都有较高的要求,直接在水体

中对浮游植物进行成像较为困难,通过将流式细胞技术与显微摄像结合,是目前实现浮游植物显微成像的可行方式。

2.3 流式细胞技术

流式细胞技术也是一类基于生物光学技术,但是不同于测量海水生物总体光学特征,流式细胞技术可以分析、计数单个颗粒物(生物),海水中颗粒物在快速流动的液流中分散,然后通过一系列光学检测器获得单个颗粒物的光学信息。流式细胞技术最初用于生物医学研究,之后成功应用于海洋微型生物的分析^[17]。由于设备的复杂性、耗能高、运行条件苛刻,流式细胞技术在海洋生物学中的应用主要还是限制于实验室,近年来有少量专门应用于现场的仪器被开发出来,特别是结合了显微摄像技术,实现对浮游植物种类较为准确的鉴定与计数,如 Fluid Imaging Technologies 开发的 FlowCAM 系统,其可以应用于走航系统或剖面分析平台;荷兰 Cyto-buoy 公司开发的 Cytobuoy 系列水下流式细胞仪,也已经成功应用于浮标、Ferrybox 等观测平台^[18];伍兹霍尔海洋研究所开发的自动流式细胞仪(FlowCytobot)已经在美国 LEO-15 海底观测站持续运行数月^[19]。

2.4 基于分子生物学的生物传感器

基于声学、光学基础的浮游生物原位观测技术在种类准确鉴定、生态功能分析与细胞动力学参数等方面的测定上都具有较大的局限性,而分子生物学技术提供了分析生物遗传信息组成、mRNA 表达水平、蛋白表达水平等信息的方法,来实现对浮游生态系统组成与功能的精确分析。在环境科学中应用分子生物学技术通常要求现场采集样品、保存样品、送回实验室分析等步骤,这样要获得浮游生物群落的组成或活性信息,需要较长的分析时间。在实验室,样品收集、提取、分析,每个步骤需要不同的仪器。因此,基于分子生物学的生物传感器的基本原理是提供一套整合的系统来实现样品自动化收集、富集和分析。目前可以实现水下原位分子生物学分析的设备有限,如环境样品处理系统(ESP)和自动微生物基因传感器(AMG)^[20]。

ESP 是由美国蒙特利湾海洋研究所(Monterey Bay Aquarium Research Institute, MBARI)开发的^[20]。ESP 采样、样品处理与分析模块,可以进行非连续采样、富集浮游生物、分子探针杂交、荧光检测等操作,结合特定的探针芯片,能够鉴定细菌、古菌、浮游植物、浮游动物等多个物种,也可以应用于赤潮生物毒

素的 ELISA 检测。ESP 已经成功应用于蒙特利湾、缅因湾等海域,可以在浅海中连续工作 1 个月,并可以在 4 000 m 水深工作数天^[21]。

3 海洋浮游生物原位观测技术的限制与展望

虽然在基于声学、光学和分子生物学等技术基础上,多种类型的浮游生物原位观测技术已经被应用于自动观测平台,推动了对海洋生物生态过程与生物地球化学过程的理解。但是毫无疑问,其中大部分观测技术尚限于实验阶段的应用或有限的观测平台。设备构造复杂、体积大、耗能高、精度低等缺点是这些技术普遍存在的问题^[2]。基于声学的观测技术侧重于分析较大空间尺度与高时间频率下浮游生物的时空分布与种群动态,但在个体体积、种类识别与丰度估算上存在着较大误差。基于叶绿素 a 活性与浮游植物吸收光谱对浮游植物组成与初级生产的估算,受到水深、耗能、体积等限制,目前还不能安装于 Bio-Argo 浮标、水下滑翔机等原位观测平台上,限制了对较大空间尺度的浮游植物组成与初级生产的认识。以 VPR 为代表的水下成像技术虽然已经较成功应用于海洋调查,但是 VPR 对水体的扰动、持续的强光照射对浮游动物迁移有着明显的影响,无法真正地反映“原位”状态;同时,生物个体成像角度、清晰度与效果都影响了其对浮游生物准确鉴定与定量。流式细胞仪在海洋自动观测中的应用刚刚起步,仅能应用于较小空间尺度上对浮游生物个体进行观测和计数,其持久性与稳定性都有待检验。

可以预见未来浮游生物原位观测设备将朝着更小型化、低耗能方向发展,使其具备自动化应用的可行性。需要引入新的电子技术、电池技术、计算方法和新材料,促进光学仪器(如水下叶绿素活性荧光仪、全波段吸收光谱仪等)、浮游生物流式细胞仪等达到在浮标或潜标等原位观测平台上连续工作数个月的要求。水下浮游生物成像系统将在三维成像、全息成像与新图像识别算法等方面达到突破^[22,23],提高种类鉴定和计数的准确性。基于分子生物学的生物传感器是海洋浮游生物原位观测技术的重要发展方向之一,新的分子生物学技术将有助于提高它们应用的范围,单分子高通量测序、微型流体力学和阵列扩增技术等一系列新技术适用于微量海水样品与快速分析,从而生物传感器设备更为小型化、分析频率更快^[2]。

参考文献(References):

- [1] Ruhl H A, Andre M, Beranzoli L, et al. Societal need for improved understanding of climate change, antropogenic impacts, and geo-hazard warning drive development of ocean observatories in European Seas[J]. *Progress in Oceanography*, 2011, 91(1): 1-33.
- [2] Paul J, Scholin C, Van Den Engh G, et al. In situ instrumentation[J]. *Oceanography* 2007, 20(2): 70-78.
- [3] Rudnic D L, Perry M J. ALPS: Autonomous and Lagrangian Platforms and Sensors[R]. California: Workshop Report, 2003: 64.
- [4] Wang Pinxian. Watch the Earth from the bottom of the sea: The third observation platform for Earth system[J]. *Journal of Nature*, 2007, 29(3): 125-130. [汪品先. 从海底观察地球: 地球系统的第三个观测平台[J]. *自然杂志* 2007 29(3): 125-130.]
- [5] Demer D A, Soule M A, Hewitt R P. A multiple-frequency method for potentially improving the accuracy and precision of in situ target strength measurements[J]. *Journal of the Acoustical Society of America*, 1999, 105(4): 153-165.
- [6] De Robertis A. Validation of acoustic echo counting studies of zooplankton behavior[J]. *ICES Journal of Marine Science*, 2001, 58: 38-43.
- [7] Jaffe J S, Ohman M D, De Robertis A. Sonar estimates of daytime activity levels of *Euphausia pacifica* in Saanich Inlet[J]. *Canadian Journal of Fisheries & Aquatic Sciences*, 1999, 56(11): 2 000-2 010.
- [8] Lavery A C, Stanton T K, McGehee D E, et al. Three-dimensional modeling of acoustic backscattering from fluid-like zooplankton[J]. *Journal of the Acoustical Society of America*, 2002, 111(3): 156-162.
- [9] Wiebe P H, Stanton T K, Greene C H, et al. BIOMAPER-II: An integrated instrument platform for coupled biological and physical measurements in coastal and oceanic regimes[J]. *IEEE Journal of Oceanic Engineering*, 2002, 27(3): 256-278.
- [10] Holliday D V, Staton T K. Active acoustical assessment of plankton and micronekton[C]//Medwin H, ed. *Sounds in the Sea: From Ocean Acoustics to Acoustical Oceanography*. Cambridge, 2005: 355-373.
- [11] Warren J D, Stanton T K, Benfield M C, et al. "In situ measurements of acoustic target strengths of gas-bearing siphonophores" [J]. *ICES Journal of Marine Science*, 2011, 58(4): 422-432.
- [12] Lorenzen C. A method for the continuous measurement of *in vivo* chlorophyll concentration [J]. *Deep-Sea Research*, 1966, 13: 223-227.
- [13] Kolber Z, Falkowski P G. Use of fluorescence to estimate phytoplankton photosynthesis *in situ* [J]. *Limnology*, 1993, 38: 1 646-1 665.
- [14] Volent Z, Johnsen G, Hovland E K, et al. Improved monitoring of phytoplankton bloom dynamics in a Norwegian fjord by integrating satellite data, pigment analysis, and Ferrybox data with a coastal observation network [J]. *Journal of Applied Remote Sensing*

- ing 2012 ,5(1):530-561.
- [15] Boss E , Swift D , Taylor L , *et al.* Observations of pigment and particle distributions in the western North Atlantic from an autonomous float and ocean color satellite [J]. *Limnology and Oceanography* 2008 ,53: 2 112-2 122.
- [16] Ashjian C J , Davis C S , Gallagher S M , *et al.* Distribution of plankton , particles , and hydrographic features across Georges Bank described using the Video Plankton Recorder[J]. *Deep-Sea Research II* ,2001 ,48: 1-3.
- [17] Chisholm S W , Olson R J , Zettler E R , *et al.* A novel free-living prochlorophyte abundant in the oceanic euphotic zone [J]. *Nature* ,1988 ,334: 340-343.
- [18] Dubelaar G B , Groenewegen A C , Stokdijk W , *et al.* Optical plankton analyser: A flow cytometer for plankton analysis , II: Specifications [J]. *Cytometry* ,1989 ,10: 529-539.
- [19] Olson R J , Shalapyonok A , Sosik H M. An automated submersible flow cytometer for analyzing pico- and nanophytoplankton: FlowCytobot [J]. *Deep-Sea Research II* ,2003 ,50: 301-315.
- [20] Greenfield D I , Marin III R , Jensen S , *et al.* Application of the Environmental Sample Processor (ESP) methodology for quantifying *Pseudo-nitzschia australis* using ribosomal RNA-targeted probes in sandwich and fluorescent in situ hybridization [J]. *Limnology and Oceanography: Methods* ,2006 ,4: 426-435.
- [21] Scholin C A , Doucette G J , Cembella A D. Prospects for developing automated systems for *in situ* detection of harmful algae and their toxins [C] // Babin M , Roesler C S , Cullen J J , eds. Real-Time Coastal Observing Systems for Ecosystem Dynamics and Harmful Algal Blooms. Paris , France: UNESCO Publishing , 2009.
- [22] Strickler J R , Hwang J S. Matched spatial filters in long working distance microscopy of phase objects [C] // Cheng P C , Hwang P P , Wu J L , eds. Focus on Modern Microscopy. World Scientific Publishing Inc. , River Edge , New Jersey , 2000: 215-232.
- [23] Hobson P R , Watson J. The principles and practice of holographic recording of plankton [J]. *Journal of Optics A: Pure & Applied Optics* ,2002 ,4(4) : 12-22.

The Progress of In Situ Observation of Marine Plankton

Chen Jixin , Huang Bangqin , Liu Xin

(State Key Laboratory of Marine Environmental Science , College of the Environment and Ecology , Xiamen University , Xiamen 361005 , China)

Abstract: *In situ* observation techniques got rapid development in the process of biological oceanography research , from the physiological and ecological response of marine biodiversity , marine biological and ecological processes of macro and change mechanism and so on , which greatly improved the marine biology , ecology and biogeochemical processes of different temporal and spatial scales. Current techniques including *in situ* optical detection technology , underwater microscopic camera and automatic identification technology , underwater flow cytometry technology , and the biosensor technology based on molecular biology , broaden the study scope of each type of observation platform. This paper will focus on present technology development of *in situ* observation of the marine plankton , application and their prospect in the three-dimensional ocean observation system.

Key words: Marine plankton; *In situ* observation; Molecular biosensor; Bio-optical sensor; Flow cytometry.